"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و چهارم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

DOR: 20.1001.1.15625540.1401.24.3.4.9

# ارزیابی فنوتیپی، تجزیه ارتباطی و حاشیه‌نویسی ژن‌های مرتبط با پژمردگی برگ گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط تنش خشکی

# Phenotyping, association analysis and annotation of genes related to leaf wilting of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling stage under drought stress conditions

حسین عبدی[۱]، هادی علی‌پور[۲]، ایرج برنوسی[۳] و جعفر جعفرزاده[۴]

## چکیده

**عبدی، ح.، ه. علی‌پور، ا. برنوسی و ج. جعفرزاده. ۱۴۰۱.** ارزیابی فنوتیپی، تجزیه ارتباطی و حاشیه‌نویسی ژن‌های مرتبط با پژمردگی برگ گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط تنش خشکی. **نشریه علوم زراعی ایران. ۲۴ (۳): ۲۶۵ -۲۵۱.**

**غربالگری سریع ژرم‌پلاسم گیاهی در مراحل اولیه رشد و شناسایی مبنای ژنتیکی شاخص پژمردگی برگ گندم در مرحله گیاهچه‌ای برای برنامه‌های اصلاحی گندم ضروری است. در تحقیق حاضر، تعداد ۲۹۰ ژنوتیپ گندم نان ایرانی شامل ۹۰ رقم زراعی و ۲۰۰ توده بومی در سال ۱۴۰۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در شرایط تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای از نظر شاخص پژمردگی برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به لحاظ میزان پژمردگی برگ تنوع وجود داشت و توده‌های بومی به‌طور معنی‌داری، (حدود ۱۲ درصد) از نمره پژمردگی بیشتری نسبت به ارقام زراعی برخوردار بودند که این موضوع می‌تواند نتیجه مستقیم یا غیرمستقیم گزینش باشد. از نظر شاخص پژمردگی برگ حدود نه درصد از ارقام زراعی و سه درصد از توده‌های بومی در گروه متحمل به تنش خشکی قرار گرفتند. تجزیه ارتباطی با دو روش GLM و MLM تقریبا نتایج یکسانی داشت. کروموزم‌های 3B، 2A، 7B، 1A، 3A، 4B، 5B، 6A و 6B به‌ترتیب بیشترین تعداد ارتباط نشانگر با شاخص پژمردگی برگ را در کل جمعیت داشتند که تنوع فنوتیپی صفت را از ۶ الی ۲۰ درصد توجیه می‌کردند. حاشیه‌نویسی نشانگرهای معنی‌دار، تاییدکننده نتایج تجزیه GWAS بود و نشان داده شد که تعداد پنج نشانگر روی کروموزوم‌های 1A، 2A، 3A و 7B با ژن‌هایی که در تحمل گیاه گندم به تنش خشکی نقش دارند، هم‌ردیفی داشتند. جزء جدایی ناپذیر غشا بودن، فسفوریلاسیون پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌های متیل ترانسفراز و اتصال یون روی ($Zn^{2+}$) بخشی از کارکردهای مولکولی و فرآیندهای زیستی ژن‌های یاد شده بودند. یافته‌های تحقیق حاضر، بینشی عمیق در رابطه با پژمردگی برگ گندم‌های نان ایرانی در شرایط تنش خشکی ارائه می‌دهد که می‌توان از آن در برنامه‌های گزینشی آتی گندم نان استفاده کرد.**

**واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباطی در سطح ژنوم، شاخص پژمردگی برگ، کروموزوم، گندم نان و نشانگرهای مولکولی**

---

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰

این مقاله مستخرج از رساله دکتری نگارنده اول می باشد

۱- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: ha.alipour@urmia.ac.ir)
۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- استادیار مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

**مقدمه**

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در سراسر جهان است که مقدار قابل توجهی از کالری و پروتئین رژیم غذایی انسان را تامین می‌کند. در سال‌های اخیر تقاضا برای محصولات کشاورزی و نیاز به افزایش تولید به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. وقوع تنش‌های محیطی، به‌ویژه تنش خشکی، باعث کاهش شدید عملکرد گندم در سرتاسر جهان شده و محدودیت آب تقریباً در تمام مناطق جهان، به‌خصوص ایران، به یک پدیده متداول تبدیل شده است. کمبود آب باعث افزایش فشار به منابع آبی برای آبیاری سایر محصولات با ارزش اقتصادی بالاتر نسبت به گندم و برای استفاده در مناطق شهری و مصارف صنعتی شده و باعث افزایش شدت تنش بر گیاه گندم می‌شود. بنابراین لازم است در زراعت گندم افزایش بهره‌وری آب با مصرف آب کمتر، مورد توجه قرار داده شود (Richards, 2022).

علی‌رغم تحقیقات وسیع درباره گیاه گندم، بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی پاسخ گیاه به تنش خشکی کماکان مبهم باقی‌مانده است. یکی از این جنبه‌ها، معماری ژنتیکی تحمل به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای است که نیاز به درک دقیق دارد (Sallam *et al*., 2018). اگرچه در مناطق با آب و هوای مدیترانه‌ای تنش خشکی عمدتا در انتهای فصل اتفاق می‌افتد، اما به دلیل تنوع در الگوی توزیع بارندگی، کمبود آب ممکن است در مراحل اولیه رشد گیاه نیز رخ دهد (Maccaferri *et al*., 2011). از این رو، اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها در شرایط رطوبت کم خاک به یک راهبرد تحمل به تنش خشکی تبدیل شده است (Dodig *et al*., 2015). استفاده از رطوبت خاک در مراحل اولیه رشد گندم جهت حصول عملکرد دانه بالا بسیار مهم است، زیرا افزایش زیست توده و عملکرد دانه در ژنوتیپ‌هایی که قدرت رشد اولیه بیشتری دارند به اثبات رسیده است و اکثر صفات گیاهچه‌ای از جمله سطح برگ، ارتفاع گیاهچه و وزن تر و خشک گیاهچه همبستگی مثبت معنی‌داری با اجزای عملکرد گندم دارند (Sabiel *et al*., 2017). با این حال، رشد اولیه بیشتر ممکن است باعث کاهش آب موجود در خاک شده و تنش خشکی انتهایی را افزایش دهد، بنابراین اثر قدرت گیاهچه و رشد اولیه آن بستگی به شرایط اقلیمی محل دارد (Zhao *et al*., 2019). محققان شاخص پژمردگی برگ در مرحله گیاهچه‌ای را صفت مناسبی برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی در گندم عنوان کرده‌اند (Ahmed *et al*., 2021; Sallam *et al*., 2022). مفید بودن این شاخص علاوه بر گندم در سایر گیاهان زراعی دیگر نیز به اثبات رسیده است (Sayed *et al*., 2008; Pungulani *et al*., 2013; Cai *et al*., 2013). مشاهده پژمردگی برگ‌ها در گیاهان غلاتی از نظر شدت و مدت زمان اعمال تنش خشکی در تحقیقات حائز اهمیت است (Praba *et al*., 2009)، با این حال نحوه اندازه‌گیری شاخص پژمردگی برگ یکی از چالش‌های مهم در استفاده از آن می‌باشد. در سال‌های اخیر پژوهشگران برای فنوتیپ‌سنجی صفات مختلف گیاهی از جمله پژمردگی برگ از روش‌های نوین و با توان عملیاتی بالا استفاده می‌کنند (Kim *et al*., 2021). در یکی از این روش‌ها، نمره‌دهی میزان پژمردگی برگ بر اساس پردازش تصاویر حاصل از پهپاد انجام شد (Zhou *et al*., 2020). در آزمایش دیگری، از یک روش مبتنی بر تحلیل تصاویر سه بعدی که با اسکنرهای لیزری تهیه شده بودند، برای تشخیص هوشمند پژمردگی برگ استفاده شد (Cai *et al*., 2013). با وجود این فناوری‌های نوین، هنوز هم در بسیاری از مطالعات، ارزیابی بصری و نمره‌دهی شاخص پژمردگی برگ توسط محقق یک روش ساده و کارآمد محسوب شده و استفاده از آن توصیه می‌شود (Sayed *et al*., 2008; Sallam *et al*., 2018; Ahmed *et al*., 2021; Sallam *et al*., 2022).

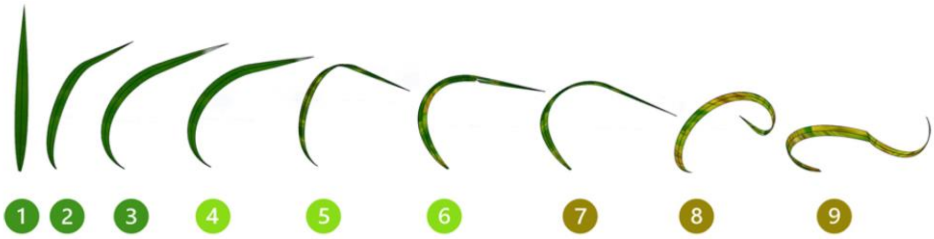
طی یک دهه گذشته، مطالعات ارتباطی در سطح ژنوم (genome-wide association studies: GWAS) از یک ابزار نویدبخش به یک روش قدرتمند و رویکردی پیشرفته و فراگیر برای ارزیابی معماری ژنتیک صفات تبدیل شده است. تجزیه GWAS علاوه بر شناسایی ارتباط نشانگر با صفت، جهت تأیید جایگاه‌های شناسایی شده با روش‌های دیگر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tibbs Cortes *et al*., 2021). انتشار توالی‌های مختلف ژنوم گندم، امکان حاشیه‌نویسی ژن با کیفیت بالا (High-quality annotated) را فراهم کرده و ضمن استفاده از تجزیه GWAS، به محققان برای تحلیل دقیق ژنتیکی صفات پیچیده در گندم کمک می‌کند (Alqudah *et al*., 2020). در همین رابطه، احمد و همکاران (Ahmed *et al*., 2021) تنوع ژنتیکی بالایی برای پژمردگی برگ گندم‌های بهاره گزارش کردند و در شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با این شاخص، ۱۰۴ ارتباط معنی‌دار برای تحمل و حساسیت به تنش خشکی شناسایی کردند. بررسی‌های بیشتر این محققان با حاشیه‌نویسی نشانگرهای معنی‌دار حاکی از وجود یک ژن مؤثر در تنظیم تحمل به تنش خشکی بود. در یک تحقیق مشابه، سالام و همکاران (Sallam *et al*., 2022) با ترکیب نتایج حاصل از GWAS و نقشه‌برداری QTL به ارزیابی ژن‌های کاندید و شبکه SNPهای کنترل‌کننده پژمردگی برگ در مجموعه‌ای از گندم-های زمستانه پرداختند و نتیجه‌گیری نمودند که یک ژن مهم در پژمردگی برگ ناشی از تنش خشکی نقش دارد.

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی فنوتیپی ارقام و توده‌های بومی گندم نان ایران از نظر وضعیت پژمردگی برگ در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط تنش خشکی بود. به‌علاوه تجزیه ارتباطی در سطح ژنوم و حاشیه‌نویسی ژن‌های مرتبط با پژمردگی برگ گندم جهت دستیابی به درک دقیق این شاخص نیز مورد توجه بوده است.

## مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، تعداد ۲۹۰ ژنوتیپ گندم نان ایرانی شامل ۹۰ رقم زراعی معرفی شده در طی یک قرن گذشته (جدول ۱) و ۲۰۰ توده بومی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور (جدول ۲) در سال ۱۴۰۰ در شرایط تنش خشکی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح آلفا لاتیس با دو تکرار اجرا شد. بدین منظور از گلدان‌های کیسه‌ای مشکی رنگ به طول ۵۰ و قطر ۱۰ سانتی‌متر که با خاک و ماسه با نسبت ۳ به ۱ پر شده بودند، استفاده شد. در هر گلدان تعداد چهار عدد بذر کشت شد که پس از سبز شدن، دو بوته در هر گلدان حفظ و بقیه آنها حذف شدند. گیاهان از زمان کاشت تا پنج هفته (مرحله رشدی ۱۸ زادوکس) به‌صورت عادی آبیاری شدند. از هفته پنجم به بعد، تنش خشکی با آبیاری تا حد ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه، تا هفته نهم پس از کاشت (مرحله رشدی ۲۹ زادوکس) اعمال شد. جهت ارزیابی شاخص پژمردگی برگ از روش احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2021) استفاده شد. در این روش نمرات پژمردگی از ۱ (متحمل) تا ۹ (حساس) (مطابق با شکل ۱) به هر ژنوتیپ اختصاص داده شد. جهت تجزیه داده‌ها، ابتدا فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مختلف محاسبه شد و سپس تفاوت بین توده‌های بومی و ارقام زراعی از نظر شاخص پژمردگی برگ با استفاده از آزمون t مستقل در نرم‌افزار SPSS 26 انجام شد. با توجه به شرایط آزمایش گلخانه‌ای و سودمند نبودن طرح آلفا لاتیس، تجزیه واریانس داده‌ها بر مبنای طرح کاملاً تصادفی در بسته آماری agricolae برنامه R اجرا شد.

ژنوتیپ‌سنجی مواد گیاهی مورد ارزیابی با استفاده از روش توالی‌یابی (Genotyping by Sequencing: GBS) توسط علی‌پور (Alipour, 2016) در دانشگاه ایالتی کانزاس امریکا انجام و جزئیات آن قبلاً توصیف شده است (Alipour *et al*., 2017). داده‌های حاصل از




شکل ۱- درجه پژمردگی برگ گندم

Fig. 1. Degree of wheat leaf wilting (Ahmad *et al*., 2021)

توالی‌یابی برای 64 bp تیمار شده و خوانش‌های یکسان داخل تگ‌ها (Tags) گروه‌بندی شدند. تگ‌های با توالی یکسان برای شناسایی SNPها داخل تگ‌ها هم‌ردیف شده و فراخوانی SNPها با استفاده از (Universal Network-Enabled Analysis Kit: UNEAK GBS pipeline) که بخشی از بسته بیوانفورماتیکی TASSEL است، انجام شد (Bradbury *et al*., 2007). پس از آن جانهی داده‌های گمشده در برنامه BEAGLE v3.3.273 با استفاده از ژنوم مرجع w7984 انجام شد (Alipour *et al*., 2019b). جانهی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها در جمعیت و با مدل مخفی مارکوف (Hidden Markov model) برای اختصاص هاپوتایپ‌ها و پر کردن داده‌های گمشده انجام شد. در نهایت، SNPهایی با هتروزیگوسیتی بیشتر از ۱۰ درصد و فراوانی آلل‌های جزئی کمتر از ۵ درصد برای کاهش دادن نتایج خطای مثبت حذف شدند و سایر SNPها برای تجزیه ارتباطی در سطح ژنوم باقی گذاشته شدند.

از هر دو روش مدل خطی عمومی (General linear model: GLM) و مدل خطی مخلوط (Mixed linear model: MLM) برای به‌دست آوردن تخمین بی‌طرفانه از اثرات نشانگر استفاده شد. این مدل‌ها در بسته آماری GAPIT در نرم‌افزار R (Lipka *et al*., 2012) اجرا شدند. در رویکرد GLM از سه مؤلفه اول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و در رویکرد MLM از سه مؤلفه اول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و روابط خویشاوندی (K) به عنوان کوواریت جهت شناسایی ارتباطات نشانگر-صفت استفاده شد. تجزیه ارتباطی برای توده‌های بومی و ارقام زراعی گندم و برای مجموع این دو (کل جمعیت) به تفکیک انجام شد. از آستانه $-\log_{10}(p) > 3$ برای بیان آماری ارتباطات معنی‌دار استفاده شد (Sun *et al*., 2017; Yan *et al*., 2019).

توالی‌های اطراف کلیه SNPهای مرتبط با شاخص پژمردگی برگ گندم در پایگاه داده EnsemblPlants (http://plants.ensembl.org/index.html) با استفاده از ابزار BLAST (Basic local alignment search tools) و هم‌ردیفی با ژنوم IWGSC RefSeq v1.0 (https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Annotations) حاشیه‌نویسی شدند. پس از هم‌ردیفی توالی‌های SNP با ژنوم مرجع، ژن‌های هم‌پوشان با بالاترین درصد تشابه (ID) و ارزش مورد انتظار (E-Val) برای پردازش و تفسیر انتخاب شدند. هستی‌شناسی ژن‌های منتخب که شامل کارکرد مولکولی، فرآیند زیستی و جزء سلولی بود، از پایگاه داده ensemble-gramene (http://ensembl.gramene.org) استخراج شد.

## نتایج و بحث

نمرات مربوط به ارزیابی بصری پژمردگی برگ برای ژنوتیپ‌های گندم در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ‌های گندم از نظر شاخص پژمردگی برگ تفاوت معنی‌داری داشته و توده‌های بومی به‌طور معنی‌داری نمرات پژمردگی بیشتری نسبت به ارقام زراعی اصلاح شده داشتند (جدول ۳). پژمردگی برگ یک نشانه رایج در گیاهان حساس به تنش خشکی است. متحمل بودن ارقام زراعی گندم نسبت به توده‌های محلی به دلیل حدود نیم قرن اجرای برنامه‌های گزینشی منظم و فرآیندهای به‌نژادی انجام شده روی آنها، تا حد زیادی قابل انتظار بود (Alipour *et al*., 2019a). به نظر می‌رسد که طی مراحل به‌نژادی، تحمل به تنش خشکی و پژمردگی برگ به طور مستقیم و غیرمستقیم مورد توجه به‌نژادگران گندم بوده است. تمایز بین توده‌های بومی و ارقام زراعی گندم پیش از این برای عملکرد و سایر صفات گیاهی نیز گزارش شده بود (Alipour *et al*., 2021a). در میان ارقام زراعی نیز به دلیل تفاوت در عادت رشدی، تفاوت معنی‌داری از نظر

جدول ۱- ارقام زراعی گندم مورد مطالعه و شاخص پژمردگی برگ مربوط به آن‌ها

Table 1. Studied wheat cultivars and their leaf wilting index (LWI)

| No. | Wheat cultivars | LWI | No. | Wheat cultivars | LWI | No. | Wheat cultivars | LWI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4820 | 5.0 | 31 | FRONTANA | 5.5 | 61 | OHADI | 8.0 |
| 2 | ADL | 4.5 | 32 | GAHAR | 4.0 | 62 | PANJAMO62 | 4.5 |
| 3 | AFLAK | 5.0 | 33 | GHABOUS | 5.0 | 63 | PARSI | 5.0 |
| 4 | AKBARI | 5.0 | 34 | GHODS | 2.5 | 64 | PISHGAM | 3.5 |
| 5 | AKOVA | 7.5 | 35 | GOLESTAN | 3.5 | 65 | PISHTAZ | 3.0 |
| 6 | ALBORZ | 3.5 | 36 | HAMOON | 4.5 | 66 | RASHID | 3.0 |
| 7 | ALVAND | 6.5 | 37 | HOMA | 4.5 | 67 | REYHANI | 6.5 |
| 8 | ARTA | 4.5 | 38 | INIA | 6.0 | 68 | RIJAW | 6.0 |
| 9 | ARVAND | 5.0 | 39 | KARAJ1 | 3.5 | 69 | ROSHAN | 3.5 |
| 10 | ATRAK | 5.0 | 40 | KARAJ2 | 5.0 | 70 | SABALAN | 5.5 |
| 11 | AZADI | 4.0 | 41 | KARAJ3 | 5.5 | 71 | SHAHI | 6.0 |
| 12 | AZAR1 | 5.0 | 42 | KARIM | 2.5 | 72 | SHAHPASSAND | 7.5 |
| 13 | AZAR2 | 6.0 | 43 | KAVEH | 6.0 | 73 | SHARYAR | 5.0 |
| 14 | BAHAR | 5.5 | 44 | KAVIR | 4.5 | 74 | SHINGHAI | 5.0 |
| 15 | BAM | 3.0 | 45 | KHAZAR1 | 4.5 | 75 | SHIRAZ | 3.5 |
| 16 | BAYAT | 6.0 | 46 | KOOHDASHT | 3.5 | 76 | SHIROODI | 3.5 |
| 17 | BEZOSTAYA | 4.5 | 47 | MAHDAVI | 4.5 | 77 | SIRVAN | 4.5 |
| 18 | BISTON | 4.0 | 48 | MAROON | 5.0 | 78 | SISON | 3.5 |
| 19 | CASGOGEN | 3.5 | 49 | MARVDASHT | 4.0 | 79 | SISTAN | 3.5 |
| 20 | CHAMRAN | 4.5 | 50 | MIHAN | 3.5 | 80 | SIVAND | 5.5 |
| 21 | CHAMRAN2 | 6.0 | 51 | MOGHAN1 | 2.0 | 81 | SPAHAN | 4.5 |
| 22 | DARAB1 | 5.0 | 52 | MOGHAN2 | 7.0 | 82 | TAJAN | 5.0 |
| 23 | DARAB2 | 4.0 | 53 | MOGHAN3 | 6.0 | 83 | TAKAB | 7.0 |
| 24 | DARYA | 7.5 | 54 | MORVARID | 6.5 | 84 | TOUBARI | 4.0 |
| 25 | DASTJERDI | 4.5 | 55 | MV17 | 5.5 | 85 | TOUS | 3.5 |
| 26 | DEYHEM | 6.0 | 56 | NAVID | 3.5 | 86 | URUOM | 7.5 |
| 27 | DEZ | 3.0 | 57 | NAZ | 5.0 | 87 | VEE/NAC | 6.0 |
| 28 | DN11 | 5.5 | 58 | NEISHABOUR | 2.5 | 88 | ZAGROS | 6.0 |
| 29 | FALAT | 4.0 | 59 | NICKNEJAD | 4.5 | 89 | ZARE | 4.0 |
| 30 | FONG | 4.0 | 60 | OFOG | 7.0 | 90 | ZARRIN | 3.5 |

جدول ۲- تودههای بومی گندم مورد مطالعه، منشأ و شاخص پژمردگی برگ مربوط به آنها

Table 2. Studied wheat landraces, their origin and leaf wilting index (LWI)

| No. | Origin | LWI | No. | Origin | LWI | No. | Origin | LWI | No. | Origin | LWI | No. | Origin | LWI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 91 | HA | 4.5 | 131 | BA | 6.0 | 171 | IL | 5.0 | 211 | SB | 4.5 | 251 | KH | 6.0 |
| 92 | HA | 7.5 | 132 | HA | 8.0 | 172 | IL | 6.5 | 212 | ES | 5.5 | 252 | KH | 5.0 |
| 93 | HA | 5.5 | 133 | YA | 5.5 | 173 | IL | 6.0 | 213 | ES | 7.0 | 253 | YA | 5.5 |
| 94 | KO | 5.5 | 134 | FA | 5.0 | 174 | IL | 4.5 | 214 | ES | 5.0 | 254 | HO | 5.5 |
| 95 | TE | 4.0 | 135 | BA | 5.0 | 175 | IL | 6.5 | 215 | ES | 5.0 | 255 | MR | 7.0 |
| 96 | TE | 5.0 | 136 | KO | 4.0 | 176 | KO | 4.5 | 216 | ES | 6.5 | 256 | KE | 5.5 |
| 97 | TE | 6.5 | 137 | KE | 4.0 | 177 | KO | 4.5 | 217 | IL | 4.5 | 257 | BA | 3.5 |
| 98 | GA | 8.0 | 138 | KE | 5.5 | 178 | KO | 7.0 | 218 | HA | 7.5 | 258 | ZA | 4.5 |
| 99 | GA | 4.0 | 139 | KE | 4.0 | 179 | HA | 5.5 | 219 | KH | 5.5 | 259 | AS | 3.5 |
| 100 | GA | 5.0 | 140 | SB | 6.0 | 180 | HA | 3.5 | 220 | YA | 6.0 | 260 | BA | 5.5 |
| 101 | GA | 4.5 | 141 | AS | 4.5 | 181 | HA | 4.5 | 221 | YA | 5.5 | 261 | BA | 5.5 |
| 102 | GA | 5.5 | 142 | AS | 4.0 | 182 | TE | 5.5 | 222 | KH | 6.0 | 262 | BA | 4.0 |
| 103 | GA | 6.0 | 143 | IL | 4.0 | 183 | TE | 6.5 | 223 | ES | 5.5 | 263 | HA | 5.0 |
| 104 | GA | 4.0 | 144 | IL | 9.0 | 184 | TE | 7.5 | 224 | YA | 4.5 | 264 | KH | 4.5 |
| 105 | MR | 4.5 | 145 | IL | 4.0 | 185 | TE | 3.0 | 225 | MR | 3.0 | 265 | YA | 6.0 |
| 106 | ZA | 3.5 | 146 | BA | 4.5 | 186 | TE | 7.5 | 226 | FA | 7.0 | 266 | AS | 8.0 |
| 107 | MA | 7.5 | 147 | BA | 3.5 | 187 | TE | 4.5 | 227 | AS | 6.5 | 267 | KO | 3.5 |
| 108 | GI | 7.5 | 148 | BA | 6.0 | 188 | TE | 6.5 | 228 | FA | 6.5 | 268 | ES | 6.5 |
| 109 | GI | 7.0 | 149 | AG | 7.0 | 189 | GA | 4.5 | 229 | AS | 5.0 | 269 | ES | 9.0 |
| 110 | GI | 5.5 | 150 | BA | 6.0 | 190 | GA | 3.5 | 230 | AS | 5.0 | 270 | AS | 6.0 |
| 111 | MA | 4.0 | 151 | BA | 7.0 | 191 | GA | 6.0 | 231 | KE | 6.0 | 271 | AS | 5.0 |
| 112 | MA | 5.5 | 152 | BA | 5.5 | 192 | GA | 5.5 | 232 | GI | 4.0 | 272 | KE | 4.5 |
| 113 | MA | 4.0 | 153 | BA | 3.5 | 193 | MR | 4.5 | 233 | GI | 5.5 | 273 | SB | 4.0 |
| 114 | KH | 5.5 | 154 | HA | 7.0 | 194 | MR | 6.0 | 234 | HO | 4.0 | 274 | SB | 6.5 |
| 115 | KH | 4.5 | 155 | HA | 8.0 | 195 | MR | 5.0 | 235 | HO | 3.0 | 275 | SB | 3.5 |
| 116 | ES | 4.5 | 156 | IL | 4.5 | 196 | MR | 5.5 | 236 | KE | 3.5 | 276 | SB | 5.0 |
| 117 | ES | 6.5 | 157 | IL | 4.5 | 197 | MR | 6.5 | 237 | AG | 4.5 | 277 | MA | 7.0 |
| 118 | ES | 3.5 | 158 | KO | 5.0 | 198 | MR | 5.0 | 238 | ES | 9.0 | 278 | ZA | 8.0 |
| 119 | BA | 5.5 | 159 | BA | 5.5 | 199 | MA | 6.5 | 239 | KU | 5.0 | 279 | AS | 3.5 |
| 120 | KH | 5.0 | 160 | BA | 7.5 | 200 | GI | 9.0 | 240 | KU | 5.0 | 280 | AS | 6.5 |
| 121 | YA | 4.5 | 161 | HA | 4.5 | 201 | MA | 2.0 | 241 | AG | 4.5 | 281 | MA | 5.5 |
| 122 | FA | 6.0 | 162 | HA | 5.5 | 202 | KH | 3.5 | 242 | GI | 4.5 | 282 | MR | 6.0 |
| 123 | FA | 5.5 | 163 | HA | 3.5 | 203 | KH | 5.5 | 243 | ZA | 5.0 | 283 | MR | 4.0 |
| 124 | AG | 4.0 | 164 | HA | 5.5 | 204 | KH | 5.5 | 244 | GI | 4.0 | 284 | HA | 6.5 |
| 125 | FA | 4.5 | 165 | HA | 3.5 | 205 | KE | 3.5 | 245 | MR | 6.0 | 285 | ZA | 8.0 |
| 126 | AG | 6.5 | 166 | BA | 8.5 | 206 | KE | 5.0 | 246 | KE | 6.5 | 286 | BA | 6.0 |
| 127 | AG | 5.5 | 167 | BA | 6.0 | 207 | SB | 3.0 | 247 | ZA | 3.5 | 287 | MA | 5.5 |
| 128 | GI | 6.0 | 168 | IL | 3.0 | 208 | SB | 5.5 | 248 | KU | 4.0 | 288 | MR | 6.0 |
| 129 | KH | 3.5 | 169 | IL | 5.0 | 209 | SB | 7.0 | 249 | ZA | 4.0 | 289 | ES | 6.0 |
| 130 | AG | 4.0 | 170 | IL | 3.5 | 210 | SB | 7.0 | 250 | MA | 8.0 | 290 | IL | 6.5 |

AG: Azarbayjan-Gharbi, AS: Azarbayjan-Shargi, BA: Bakhtaran, ES: Esfahan, FA: Fars, GA: Gazvin, GI: Gilan, HA: Hamadan, HO: Hormozgan, IL: Ilam, KE: Kerman, KH: Khorasan, KO: Kordestan, KU: Khouzestan, MA: Mazandaran, MA: Mazandaran, MR: Markazi, SB: Sistan-Balouchestan, TE: Tehran, YA: Yazd, ZA: Zanjan.

نمره پژمردگی برگ داشتند. ارقام با عادت رشد بهاره نمرات پژمردگی کمتری داشته و تحمل بالاتری به تنش خشکی نشان دادند (جدول ۴). با توجه به اینکه اطلاعات دقیقی از عادت رشدی تودههای بومی ایرانی در دسترس نیست، امکان تمایز بین آنها نیز وجود نداشت. بالا بودن شاخص پژمردگی برگ برای برخی از ارقام گندم دیم در مقایسه با ارقام آبی را میتوان چنین توجیه کرد که ارقام دیم برای

شرایط تنش خشکی انتهای فصل اصلاح شده‌اند، در حالی‌که آزمایش حاضر مربوط به اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی (گیاهچه‌ای) بوده و ممکن است ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رشد واکنش‌های متفاوتی به تنش خشکی داشته باشند (Blum, 2018).

جدول ۳- میانگین مربعات، آماره‌های توصیفی و مقایسه میانگین شاخص پژمردگی برگ در ژنوتیپ‌های گندم

Table 3. Mean square, descriptive statistics and mean comparison of leaf wilting index of wheat genotypes

| منابع تغییرات Sources of variation | درجه آزادی df | | مجموع مربعات SS | میانگین مربعات MS | | F value | سطح احتمال Pr (>F) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Genotype ژنوتیپ | 289 | | 968.98 | 3.3529 | | 3.0641 | < 2.2 $e^{-16}$ |
| Error خطا | 261 | | 285.60 | 1.0943 | | | |
| **ژنوتیپ‌های گندم Wheat genotypes** | **تعداد No.** | **حداقل Min** | **حداکثر Max** | **میانگین Mean** | **انحراف معیار Sd** | **t value** | **سطح احتمال P value** |
| Landraces توده بومی | 200 | 2 | 9 | 5.35 | 1.37 | 3.26 | 0.001 |
| Cultivars ارقام زراعی | 90 | 2 | 8 | 4.79 | 1.31 | | |

جدول ۴- میانگین مربعات و مقایسه میانگین شاخص پژمردگی برگ ژنوتیپ‌های گندم بر اساس عادت رشدی

Table 4. Mean square and means comparison of leaf wilting index of wheat genotypes based on growth habit

| | | | | | شاخص پژمردگی برگ $ Mean of LWI $ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منابع تغییرات Sources of variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات MS | F value | سطح احتمال P value | پاییزه Winter | بینابینی Facultative | بهاره Spring |
| Growth habit عادت رشدی | 2 | 10.973 | 7.22 | 0.0013 | 5.87a | 4.23b | 4.65b |
| Error خطا | 82 | 1.519 | | | | | |

$ حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند. تعداد ارقام در هر گروه پاییزه، بینابینی و بهاره به‌ترتیب: ۱۵، ۱۱ و ۵۹ ، اطلاعاتی از عادت رشدی پنج رقم دیگر در دسترس نبود

$Similar letters are not significantly different. Number of cultivars in each autumn, intermediate and spring groups: 15, 11 and 59 respectively, the growth habit of 5 cultivars was unknown

ژنوتیپ‌های گندم بر اساس شاخص پژمردگی برگ در گروه‌های محتمل، متوسط و حساس به تنش خشکی گروه‌بندی شدند که حدود نه درصد از ارقام زراعی متحمل و تنها سه درصد از توده‌های بومی در این گروه قرار گرفتند. هشت و ۳۰ درصد از ارقام زراعی و توده‌های بومی در گروه حساس به تنش خشکی و ۸۲/۲ درصد از ژنوتیپ‌ها در گروه متوسط قرار گرفتند (جدول ۵). در یک آزمایش مشابه توسط احمد و همکاران (Ahmed *et al.*, 2021) ۱۳ درصد از ژنوتیپ‌های گندم مورد ارزیابی بر اساس نمرات پژمردگی برگ در گروه متحمل قرار گرفتند. مقایسه نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های رحیمی و همکاران (Rahimi *et al.*, 2019a) که در آن ۱۰۲ رقم زراعی گندم ایران بر اساس عملکرد دانه و شاخص‌های تحمل به تنش خشکی گروه‌بندی شد، نشان داد که ارقام متحمل معرفی شده توسط آن‌ها، به جز یک مورد (اروم)، در میان ارقام متحمل و متوسط تحقیق حاضر قرار دارند. مقایسه با نتایج آزمایش نقوی و همکاران (Naghavi *et al.*, 2016) نیز نشان داد که اگرچه چهار ژنوتیپ از پنج ژنوتیپ متحمل آزمایش آن‌ها در گروه متوسط نتایج آزمایش حاضر قرار داشتند، اما هیچ‌کدام از پنج رقم حساس آن‌ها در گروه حساس تحقیق حاضر نبودند. علی‌رغم این‌که تفاوت در نتایج این پژوهش‌ها بر اساس تفاوت در شدت تنش و مرحله رشدی گیاه، قابل توجیه است؛ اما وجود برخی ژنوتیپ‌های متحمل مشترک از نظر شاخص

پژمردگی برگ و شاخص‌های تحمل به تنش خشکی بر اساس عملکرد دانه، قابل توجه می‌باشد. این نتایج می‌تواند نویدبخش غربالگری سریع و قابل اعتماد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای باشد که امروزه از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است.

جدول ۵- گروه‌بندی و فراوانی ژنوتیپ‌های گندم بر اساس شاخص پژمردگی برگ

Table 5. Classification and frequency of wheat genotypes based on leaf wilting index

| ژنوتیپ‌های گندم Wheat genotypes | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ارقام زراعی Cultivars | توده‌های بومی Landraces | واکنش به تنش خشکی Response to drought stress | | فراوانی Frequency |
| 8 (8.9%) | 6 (3%) | Tolerant | متحمل | 14 |
| 74 (82.2%) | 164 (82%) | Intermediate | متوسط | 238 |
| 8 (8.9%) | 30 (15%) | Susceptible | حساس | 38 |

Tolerant: 1-3, Intermediate: 3.5-6.5, Susceptible: 7-9    متحمل: ۳-۱، متوسط: ۶/۵-۳/۵ ، حساس: ۹-۷

بر اساس نتایج تجزیه ارتباطی، در روش GLM به‌ترتیب ۲۳، ۱۴ و ۲۲ ارتباط معنی‌دار نشانگر- صفت (marker-trait associations: MTA) برای توده‌های بومی، ارقام زراعی و مجموع آنها مشاهده شد. در روش MLM نیز برای توده‌های بومی و ارقام زراعی همان نشانگرها ارتباط معنی‌داری با شاخص پژمردگی برگ داشتند، ولی در کل جمعیت، تعداد MTAها نسبت به روش قبلی اندکی کاهش داشت (جدول ۶). در یک آزمایش علی‌پور و همکاران (Alipour *et al*., 2021b) ضمن استفاده از هر دو مدل خطی عمومی و مخلوط در تجزیه ارتباطی برای شاخص‌های پایداری در گندم گزارش دادند که نتایج رویکرد MLM با استفاده از سه مؤلفه اول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و ماتریس خویشاوندی (PCA+K)، کنترل قدرتمندتری از اثرات مخدوش‌گر ارائه می‌دهد. نتایج تجزیه GWAS برای پانل‌های ارتباطی جداگانه و یکپارچه نشان داده است که ترکیب پانل‌های ارتباطی نتایج بهتری نسبت به هر یک از پانل‌های جداگانه دارد، از رو ترکیب کلیه ژنوتیپ‌ها در یک پانل رویکرد مفیدی برای شناسایی ژن‌های کاندید مرتبط با صفات هستند (Zuffo *et al*., 2022). نتایج مشابهی توسط علی‌پور و همکاران (Alipour *et al*., 2021b) در پانل‌های ارتباطی توده‌های بومی، ارقام زراعی و ترکیب آنها در گندم‌های ایرانی گزارش شده است.

در آزمایش حاضر، ژنوم B به‌ویژه کروموزم‌های 3B و 6B در توده‌های بومی و ژنوم A به‌خصوص کروموزوم‌های 1A و 4A در ارقام زراعی گندم نواحیی از ژنوم بودند که بیشترین ارتباط را با شاخص پژمردگی برگ گندم داشتند. کروموزم‌های 3B، 2A، 7B، 1A، 3A، 4B، 5B، 6A و 6B به‌ترتیب بیشترین تعداد QTL را در کل جمعیت دارا بودند. این نشانگرها در ارقام زراعی، درصد بیشتری از تنوع فنوتیپی صفت را توجیه کردند (جدول ۶). ژنوم D حداقل تعداد MTA معنی‌دار با شاخص پژمردگی برگ را داشت. این نتیجه می‌تواند ناشی از توالی‌های حفظ شده بیشتر در ژنوم D و تعداد کمتر نشانگرهای چندشکل در این ژنوم باشد که قبلاً گزارش شده است (Alipour *et al*., 2017). رحیمی و همکاران (Rahimi *et al*., 2019b) نیز در تجزیه ارتباطی برای عملکرد دانه و اجزای عملکرد گندم گزارش دادند که ژنوم B و D به‌ترتیب حاوی بیشترین و کمترین تعداد ارتباط معنی‌دار در شرایط تنش خشکی می‌باشند. همانند یافته‌های آزمایش حاضر، سایر گزارش‌ها حاکی از آن است که کروموزوم 4A ناحیه‌ای در ژنوم گندم است که حاوی

جدول ۶- مکان کروموزوم و تعداد ارتباط‌ها (p < ۰/۰۰۱) برای شاخص پژمردگی برگ در ژنوتیپ‌های گندم

Table 6. Chromosome locus and number of associations (p <0.001) for leaf wilting index in wheat genotypes

| No. | توده‌های بومی Landraces | روش Method | موقعیت Position (cM) | ارقام زراعی Cultivars | روش Method | موقعیت Position (cM) | کل Total | روش Method | موقعیت Position (cM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | rs55209 (3B) | GLM & MLM | 78.498 | rs27872 (4A) | GLM & MLM | 99.798 | rs3346 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 |
| 2 | rs42966 (3B) | GLM & MLM | 78.498 | rs28707 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs3347 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 |
| 3 | rs46640 (3A) | GLM & MLM | 57.08 | rs54615 (4A) | GLM & MLM | 99.798 | rs3345 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 |
| 4 | rs16869 (3B) | GLM & MLM | 1.137 | rs3988 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs36599 (2A) | GLM & MLM | 59.228 |
| 5 | rs64586 (7A) | GLM & MLM | 63.946 | rs12674 (4B) | GLM & MLM | 50.376 | rs53259 (7B) | GLM & MLM | 116.277 |
| 6 | rs58739 (6B) | GLM & MLM | 48.967 | rs29674 (7A) | GLM & MLM | 61.673 | rs53260 (7B) | GLM & MLM | 116.277 |
| 7 | rs58740 (6B) | GLM & MLM | 48.967 | rs31256 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs3348 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 |
| 8 | rs5477 (3B) | GLM & MLM | 78.498 | rs26812 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs42966 (3B) | GLM & MLM | 78.498 |
| 9 | rs53259 (7B) | GLM & MLM | 116.277 | rs28818 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs20037 (2A) | GLM & MLM | 1.137 |
| 10 | rs53260 (7B) | GLM & MLM | 116.277 | rs15500 (6D) | GLM & MLM | 119.937 | rs20038 (2A) | GLM & MLM | 1.137 |
| 11 | rs3346 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 | rs3700 (6A) | GLM & MLM | 99.391 | rs8795 (1A) | GLM & MLM | 37.687 |
| 12 | rs3347 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 | rs25 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs8796 (1A) | GLM & MLM | 37.687 |
| 13 | rs30085 (2B) | GLM & MLM | 72.825 | rs2576 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs56408 (6B) | GLM & MLM | 47.831 |
| 14 | rs57898 (7A) | GLM & MLM | 0 | rs25981 (1A) | GLM & MLM | 44.512 | rs7926 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 |
| 15 | rs3348 (3B) | GLM & MLM | 75.6555 | | | | rs38257 (5B) | GLM & MLM | 82.6275 |
| 16 | rs13667 (3B) | GLM & MLM | 6.843 | | | | rs22486 (4B) | GLM & MLM | 60.612 |
| 17 | rs13668 (3B) | GLM & MLM | 6.843 | | | | rs5516 (7B) | GLM & MLM | 116.277 |
| 18 | rs5516 (7B) | GLM & MLM | 116.277 | | | | rs18593 (3A) | GLM | 143.601 |
| 19 | rs45226 (7A) | GLM & MLM | 112.84 | | | | rs46640 (3A) | GLM | 57.08 |
| 20 | rs46933 (2B) | GLM & MLM | 72.825 | | | | rs23568 (6A) | GLM | 55.893 |
| 21 | rs36754 (5D) | GLM & MLM | 168.429 | | | | rs16869 (3B) | GLM | 1.137 |
| 22 | rs36755 (5D) | GLM & MLM | 168.429 | | | | rs5477 (3B) | GLM | 78.498 |
| 23 | rs64327 (6B) | GLM & MLM | 92.187 | | | | rs5517 (7B) | MLM | 116.277 |
| 24 | | | | | | | rs30619 (1A) | MLM | 67.252 |
| 25 | | | | | | | rs7297 (2A) | MLM | 11.39 |
| PV (%) | 6-8 | | | 15-20 | | | 7-9 | | |

PV: درصدی از تغییرات فنوتیپی صفت که توسط نشانگرهای SNP توجیه می‌شود

GLM: مدل خطی عمومی و MLM: مدل خطی مخلوط

PV: the proportion of phenotypic variation explained by SNP markers (in %)

GLM: General liner model and MLM: General liner model

نشانگرهای مرتبط با تحمل به تنش خشکی است (Kirigwi *et al*., 2007; Ballesta *et al*., 2020). به‌علاوه گزارش شده است که کروموزم‌های 3B، 7B، 2A و 4A نیز حاوی ژن‌هایی با اثرات پلیوتروپیک مرتبط با سازگاری در محیط‌های بدون تنش و تنش خشکی می‌باشند (Alipour *et al*., 2021b). در یک آزمایش، آکونا-گالیندو و همکاران (Acuña-Galindo *et al*., 2015) دو meta-QTL برای سازگاری با تنش خشکی روی کروموزوم 6B در گندم شناسایی کردند. نتایج تجزیه GWAS برای شاخص پژمردگی برگ در آزمایش احمد و همکاران (Ahmed *et al*., 2021) نشان داد که چهار نشانگر واقع در کروموزوم‌های 2B، 3D و 1A به‌شدت با شاخص پژمردگی برگ گندم مرتبط بوده و دارای ضریب تبیین ۵/۴ الی ۸/۷ درصدی بودند. در آزمایش نامبردگان، موقعیت نشانگر شناسایی شده روی کروموزوم 2B برابر با ۷۳,۷۵۶۰۲۰۲۱ سانتی‌مورگان بود و در آزمایش حاضر در موقعیت ۷۲,۸۲۵ سانتی‌مورگان قرار داشت. سالام و همکاران (Sallam *et al*., 2022) نیز یک QTL روی کروموزوم 4B شناسایی کردند که با شاخص پژمردگی برگ گندم ارتباط داشت.

جهت شناسایی جزئیات مربوط به شاخص پژمردگی برگ گندم، هستی‌شناسی نشانگرهای معنی‌دار مورد ارزیابی قرار گرفت. حاشیه‌نویسی توالی‌های اطراف همه SNPهای مرتبط با شاخص پژمردگی برگ گندم نشان داد که تعداد پنج نشانگر روی کروموزوم‌های 1A، 2A، 3A و 7B با ژن‌هایی که در تحمل به تنش خشکی نقش دارند، هم‌ردیفی و هم‌پوشانی داشتند. هم‌ردیفی با درصد بالای تشابه و مقادیر بسیار پایین E-value انجام شده و باعث افزایش اطمینان به نتایج به‌دست آمده شد. این ژن‌ها دارای طیف متنوعی از کارکردهای مولکولی و فرآیندهای زیستی بودند که جزئیات مربوط به هر کدام از آنها در جدول ۷ ارائه شده است. موضوع قابل توجه این بود که یکی از این ژن‌ها که جزء جدایی ناپذیر غشا است، با پژمردگی برگ مرتبط می باشد. پیش از این نیز نقش اجزاء جدایی ناپذیر غشاهای سلولی در تنظیم پتانسیل اسمزی سلول و تنش خشکی اثبات شده است (Ali *et al*., 2019). فعالیت‌های آنزیم‌های متیل ترانسفراز و O- متیل ترانسفراز (OMTs) از جمله کارکردهای مولکولی بودند که در جریان آزمایش حاضر حاشیه‌نویسی شدند. متیلاسیون آنزیمی که توسط تعداد زیادی O- متیل ترانسفراز کاتالیز می‌شود، یکی از واکنش‌های مهم در جریان متابولیسم اولیه و یا ثانویه سلول بوده و نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های گیاه گندم دارد (Jung *et al*., 2008). اتصال یون روی ($Zn^{2+}$) از دیگر کارکردهای ژن‌های شناسایی شده بود. عنصر روی یک ریزمغذی ضروری است که با تنظیم سازوکارهای فیزیولوژیکی و مولکولی، نقش اساسی در تحمل گیاهان در برابر تنش خشکی ایفا می‌کند (Umair Hassan *et al*., 2020). فسفوریلاسیون پروتئین‌ها طی توسعه برگ پرچم و دانه گندم نیز نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی دارد (Luo *et al*., 2018). در یک آزمایش مربوط به سازگاری گندم به تنش خشکی، فعالیت ناقل تراغشایی همراه با ATPase و اتصال پروتئینی نیز گزارش شده است (Alipour *et al*., 2021b). حاشیه‌نویسی نشانگرهای شناسایی شده به‌خوبی نتایج تجزیه ارتباطی را تأیید کرده و نشان داد که یافته‌های آزمایش در راستای نتایج گزارش شده قبلی در رابطه با شناسایی سازوکارهای مولکولی پژمردگی برگ گندم (Ahmed *et al*., 2021; Sallam *et al*., 2022) و عملکرد دانه و اجزای عملکرد گندم (Rahimi *et al*., 2019b; Alipour *et al*., 2021b) در شرایط تنش خشکی می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که بر اساس شاخص پژمردگی برگ در شرایط تنش خشکی، بین

جدول ۷- حاشیه‌نویسی ژن‌های مرتبط با شاخص پژمردگی برگ در گندم

Table 7. Annotation of markers related to wheat leaf wilting index

| نشانگر Marker | توالی Sequence | Chr | Pos (cM) | E-Val | ID% | کارکرد مولکولی Molecular Function | فرآیند زیستی Biological process | جزء سلولی Cellular component |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs5517 | TGCAGAGAGCGGTCAAG GACAGCGGGTCCACGAG CACACGCACGATGGGGA GACTGGGTGCACG | 7B | 116.3 | 2.6 $e^{-18}$ | 100 | methyltransferase activity, O-methyltransferase activity, protein dimerization activity | – | – |
| rs30619 | TGCAGCGCGCAGGGCGG CCGTGCACGAAGGCCGA GATCGGAAGAGCGGGAT CACCGACTGCCCA | 1A | 67.25 | 9.2 $e^{-09}$ | 100 | ATP binding, ATPase-coupled transmembrane transporter activity, ABC-type transporter activity | transmembrane transport | integral component of membrane |
| rs7297 | TGCAGAGTGTAGTTTGG CAGTAGTTGCCGATTGT CCGCCTGTTTGAGTTTT ATGTATGTGCAAA | 2A | 11.39 | 1.6 $e^{-16}$ | 98 | histone acetyltransferase activity, zinc ion binding | regulation of transcription, DNA-templated, histone acetylation | – |
| rs46640 | TGCAGGCATTGGAGATG GTGTTTCCTTCGTGTT CACCTCTGAGGATGACA ACGTTTCTCGAGAG | 3A | 57.08 | 7.1 $e^{-25}$ | 98.4 | protein kinase activity, ATP binding, polysaccharide binding | protein phosphorylation | – |
| rs28818 | TGCAGCGAGCGCGATCT GCGAGTAGACGGCGCCG AGGTTGAAGAGCACGGC GCCCTCTCGAGAT | 1A | 44.51 | 1.0 $e^{-17}$ | 100 | protein binding | – | – |

ژنوتیپ‌های گندم نان با منشأ ایران تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. تعدادی از این ژنوتیپ‌ها، به‌ویژه ارقام زراعی، در گروه متحمل به تنش خشکی قرار گرفتند. نواحیی از ژنوم، به‌ویژه در ژنوم‌های B و A، درجه پژمردگی برگ را کنترل می‌کنند. سازوکارهای مولکولی پاسخ به تنش خشکی که منجر به پژمردگی برگ می‌شود تا حد قابل قبولی به وسیله هستی‌شناسی ژن‌ها تشریح شد. در مجموع می‌توان اظهار داشت که نتایج آزمایش حاضر، شناختی جدید و دقیق در رابطه با پژمردگی برگ گندم‌های نان با منشأ ایران را ارائه می‌دهد که می‌توان از آن در برنامه‌های به‌نژادی آتی گندم استفاده کرد. با این حال، لازم است تحقیقات تکمیلی، به‌خصوص روی ژرم‌پلاسم‌هایی با حداقل تفاوت در مراحل فنولوژیک اجرا شود.

## منابع مورد استفاده

## References


**Acuña-Galindo, M. A., R. E. Mason, N. K. Subramanian and D. B. Hays. 2015.** Meta-analysis of wheat QTL regions associated with adaptation to drought and heat stress. Crop Sci. 55(2): 477-492.

**Ahmed, A. A., E. A. Mohamed, M. Y. Hussein and A. Sallam. 2021.** Genomic regions associated with leaf wilting traits under drought stress in spring wheat at the seedling stage revealed by GWAS. Environ. Exp. Bot. 184: 104393.

**Ali, Q., S. Ali, N. Iqbal, M. T. Javed, M. Rizwan, R. Khaliq, S. Shahid, R. Perveen, S. A. Alamri, M. N. Alyemeni and L. Wijaya. 2019.** Alpha-tocopherol fertigation confers growth physio-biochemical and qualitative yield enhancement in field grown water deficit wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci. Rep. 9(1): 1-15.

**Alipour, H. 2016.** Association mapping of the main agronomic traits in bread wheat. PhD thesis. University of Tehran, Iran. (In Persian with English abstract).

**Alipour, H., M. R. Bihamta, V. Mohammadi, S. A. Peyghambari, G. Bai and G. Zhang. 2017.** Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. Front. Plant Sci. 8: 1293.

**Alipour, H., H. Abdi, Y. Rahimi and M. R. Bihamta. 2019a.** Investigating grain yield and yield stability of wheat cultivars introduced in Iran over the last half century. Cereal Res. 9(2): 157-167. (In Persian with English abstract).

**Alipour, H., G. Bai, G. Zhang, M. R. Bihamta, V. Mohammadi and S. A. Peyghambari. 2019b.** Imputation accuracy of wheat genotyping-by-sequencing (GBS) data using barley and wheat genome references. PLoS One. 14(1): e0208614.

**Alipour, H., H. Abdi and M. R. Bihamta. 2021a.** Assessment of growing degree-days values of phenological stages in some Iranian bread wheat cultivars and landraces. J. Crop Breed. 12(34): 71-82. (In Persian with English abstract).

**Alipour, H., H. Abdi, Y. Rahimi and M. R. Bihamta. 2021b.** Dissection of the genetic basis of genotype-by-environment interactions for grain yield and main agronomic traits in Iranian bread wheat landraces and cultivars. Sci. Rep. 11(1): 1-17.

**Alqudah, A. M., J. K. Haile, D. Z. Alomari, C. J. Pozniak, B. Kobiljski and A. Börner. 2020.** Genome-wide and SNP network analyses reveal genetic control of spikelet sterility and yield-related traits in wheat. Sci. Rep. 10(1): 1-12.

**Ballesta, P., F. Mora and A. Del Pozo. 2020.** Association mapping of drought tolerance indices in wheat: QTL-rich regions on chromosome 4A. Sci. Agric. 77: e20180153.

**Blum, A. 2018.** Plant Breeding for Stress Environments (1st Ed.). CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

**Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T. M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007.** TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics. 23(19): 2633-2635.

**Cai, X., Y. Sun, Y. Zhao, L. Damerow, P.S. Lammers, W. Sun, J. Lin, L. Zheng and Y. Tang. 2013.** Smart detection of leaf wilting by 3D image processing and 2D Fourier transform. Comput. Electronic Agric. 90: 68-75.

**Dodig, D., M. Zorić, M. Jović, V. Kandić, R. Stanisavljević and G. Šurlan-Momirović. 2015.** Wheat seedlings growth response to water deficiency and how it correlates with adult plant tolerance to drought. J. Agric. Sci. 153(3): 466-480.

**Jung, J. H., M. J. Hong, D.Y. Kim, J. Y. Kim, H. Y. Heo, T. H. Kim, C. S. Jang and Y. W. Seo. 2008.** Structural and expressional divergence of genes encoding O-methyltransferase in wheat. Genome. 51(10): 856-869.

**Kim, M., C. Lee, S. Hong, S. L. Kim, J. H. Baek and K. H. Kim. 2021.** High-throughput phenotyping methods for breeding drought-tolerant crops. Int. J. Mol. Sci. 22(15): 8266.

**Kirigwi, F. M., M. Van Ginkel, G. Brown-Guedira, B. S. Gill, G. M. Paulsen and A. K. Fritz 2007.** Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. Mol. Breed. 20(4): 401-413.

**Lipka, A. E., F. Tian, Q. Wang, J. Peiffer, M. Li, P. J. Bradbury, M. A. Gore, E. S. Buckler and Z. Zhang. 2012.** GAPIT: genome association and prediction integrated tool. Bioinformatics. 28(18): 2397-2399.

**Luo, F., X. Deng, Y. Liu and Y. Yan. 2018.** Identification of phosphorylation proteins in response to water deficit during wheat flag leaf and grain development. Bot. Stud. 59(1): 1-17.

**Maccaferri, M., M. C. Sanguineti, A. Demontis, A. El-Ahmed, L. Garcia del Moral, F. Maalouf, M. Nachit, N. Nserallah, H. Ouabbou, S. Rhouma and C. Royo. 2011.** Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. J. Exp. Bot. 62(2): 409-438.

**Naghavi, M. R., M. Moghaddam. M. Toorchi and M. R. Shakiba. 2016.** Evaluation of spring wheat cultivar based on drought resistance indices. J. Crop Breed. 8(17): 192-207. (In Persian with English abstract).

**Praba, M. L., J. E. Cairns, R. C. Babu and H. R. Lafitte. 2009.** Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat. J. Agron. Crop Sci. 195(1): 30-46.

**Pungulani, L. L., J. P. Millner, W. M. Williams and M. Banda. 2013.** Improvement of leaf wilting scoring system in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): from qualitative scale to quantitative index. Aust. J. Crop Sci. 7(9): 1262-1269.

**Rahimi, Y., M. R. Bihamta, A. Taleie, H. Alipour and P. K. Ingvarsson. 2019a.** Applying an artificial neural

network approach for drought tolerance screening among Iranian wheat landraces and cultivars grown under well-watered and rain-fed conditions. Acta. Physiol. Plant. 41(9): 1-17.

**Rahimi, Y., M. R. Bihamta, A. Taleie, H. Alipour and P. K. Ingvarsson. 2019b.** Genome-wide association study of agronomic traits in bread wheat reveals novel putative alleles for future breeding programs. BMC Plant Biol. 19(1): 1-19.

**Richards, R. A. 2022.** Drought. *In:* Reynolds, M.P., H.J. Braun (Eds) Wheat Improvement. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3_23.

**Sabiel, S. A., S. Huang, X. Hu, X. Ren, C. Fu, J. Peng and D. Sun. 2017.** SNP-based association analysis for seedling traits in durum wheat (*Triticum turgidum* L. durum (Desf.)). Breed. Sci. 67: 83–94.

**Sallam, A., A. M. Mourad, W. Hussain and P. Stephen Baenziger. 2018.** Genetic variation in drought tolerance at seedling stage and grain yield in low rainfall environments in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica. 214(9): 1-18.

**Sallam, A., S. Eltaher, A. M. Alqudah, V. Belamkar and P. S. Baenziger. 2022.** Combined GWAS and QTL mapping revealed candidate genes and SNP network controlling recovery and tolerance traits associated with drought tolerance in seedling winter wheat. Genomics. 114(3): 110358.

**Sayed, M. A., H. Schumann, K. Pillen, A. A. Naz and J. Léon. 2012.** AB-QTL analysis reveals new alleles associated to proline accumulation and leaf wilting under drought stress conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC genet. 13(1): 1-12.

**Sun, C., F. Zhang, X. Yan, X. Zhang, Z. Dong, D. Cui and F. Chen. 2017.** Genome-wide association study for 13 agronomic traits reveals distribution of superior alleles in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. Plant Biotechnol. J. 15(8): 953-969.

**Tibbs Cortes, L., Z. Zhang and J. Yu. 2021.** Status and prospects of genome-wide association studies in plants. Plant Genome. 14(1): e20077.

**Umair Hassan, M., M. Aamer, M. Umer Chattha, T. Haiying, B. Shahzad, L. Barbanti, M. Nawaz, A. Rasheed, A. Afzal, Y. Liu and H. Guoqin. 2020.** The critical role of zinc in plants facing the drought stress. Agriculture. 10(9): 396.

**Yan, X., L. Zhao, Y. Ren, Z. Dong, D. Cui and F. Chen. 2019.** Genome-wide association study revealed that the TaGW8 gene was associated with kernel size in Chinese bread wheat. Sci. Rep. 9(1): 1-10.

**Zhao, Z., G. J. Rebetzke, B. Zheng, S. C. Chapman and E. Wang. 2019.** Modelling impact of early vigour on wheat yield in dryland regions. J. Exp. Bot. 70(9): 2535-2548.

**Zhou, J., J. Zhou, H. Ye, M. L. Ali, H. T. Nguyen and P. Chen. 2020.** Classification of soybean leaf wilting due to drought stress using UAV-based imagery. Comput. Electronic Agric. 175: 105576.

**Zuffo, L. T., R. O. DeLima and T. Lübberstedt. 2022.** Combining data sets for maize root seedling traits increases the power of GWAS and genomic prediction accuracies. J. Exp. Bot. 73(16): 5460-5473.

# Phenotyping, association analysis and annotation of genes related to leaf wilting of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling stage under drought stress conditions

**Abdi, H.[1] H. Alipour[2], I. Bernousi[3] and J. Jafarzadeh[4]**

## ABSTRACT

**Abdi, H., H. Alipour, I. Bernousi and J. Jafarzadeh. 2022.** Phenotyping, association analysis and annotation of genes related to leaf wilting of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling stage under drought stress conditions. **Iranian Journal of Crop Sciences. 24(3): 251-265. (In Persian).**

Rapid screening of plant germplasm in the early stages of growth and determining the genetic basis of wheat leaf wilting index at the seedling stage is necessary for wheat breeding programs. In the present research, leaf wilting index for 290 Iranian bread wheat genotypes, including; 90 cultivars and 200 landraces were studied under drought stress conditions at the seedling stage in 2021 in research greenhouse of faculty agriculture of Urmia University, Urmia, Iran. The results showed that there was variation between the studied genotypes for leaf wilting index, and the landraces had significantly 12% more wilting scores than cultivars. This can be attributed to direct or indirect selection by breeders. The leaf wilting index of about 9% of cultivars and 3% of landraces were identified in drought stress tolerant group. GWAS had nearly the same results as general lineare model and MLM methods. Chromosomes 3B, 2A, 7B, 1A, 3A, 4B, 5B, 6A and 6B, respectively, had the highest number of marker-trait associations in the entire population which explained the phenotypic variation of the trait from 6 to 20%. Annotation of significant markers confirmed the results of GWAS analysis and showed that five markers on chromosomes 1A, 2A, 3A and 7B were aligned with different genes involved in drought stress tolerance. An integral component of membrane, protein phosphorylation, methyltransferase activity and zinc ion binding were part of the molecular functions and biological processes of the identified genes. The findings of this research provide a deep insight into the variation of leaf wilting traits in Iranian bread wheat germplasm under drought stress conditions, which can be used as selction criterium in the national bread wheat improvement programs.

**Key words:** Bread wheat Chromosome, Genome wide association study, Leaf wilting index, and Molecular markers

---

**Received: July, 2022 Accepted: October, 2022**
1. PhD Student, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Prof., Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding author) (Email: ha.alipour@urmia.ac.ir)
3. Associate Prof., Urmia University, Urmia, Iran
4. Assistant Prof., Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran